

Dette dokument er et dokumentationsredskab, og institutionerne påtager sig intet ansvar herfor

► B

KOMMISSIONENS OTTENDE DIREKTIV

af 15. juni 1978

om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til den officielle kontrol med foderstoffer

(78/633/EØF)

(EFT L 206 af 29.7.1978, s. 43)

Ændret ved:

	nr.	Tidende side	dato
► <u>M1</u> Kommissionens direktiv 81/680/EØF af 30. juli 1981	L 246	32	29.8.1981
► <u>M2</u> Kommissionens direktiv 84/4/EØF af 20. december 1983	L 15	28	18.1.1984

▼B**KOMMISSIONENS OTTENDE DIREKTIV**

af 15. juni 1978

om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til den officielle kontrol med foderstoffer

(78/633/EØF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det europæiske økonomiske Fællesskab.

under henvisning til Rådets direktiv 70/373/EØF af 20. juli 1970 om indførelse af fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder for så vidt angår den officielle kontrol med foderstoffer (1), senest ændret ved tiltrædelsesakten, særlig artikel 2, og

ud fra følgende betragtninger:

Ved nævnte direktiv er det fastsat, at den officielle kontrol med foderstoffer til konstatering af, om de betingelser, der er fastsat på grundlag af administrativt eller ved lov fastsatte bestemmelser om foderstoffernes beskaffenhed og sammensætning, er opfyldt, foretages efter fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder;

der er allerede ved Kommissionens direktiver 71/250/EØF af 15. juni 1971⁽²⁾, 71/393/EØF af 18. november 1971⁽³⁾, 72/199/EØF af 27. april 1972⁽⁴⁾, 73/46/EØF af 5. december 1972⁽⁵⁾, 74/203/EØF af 25. marts 1974⁽⁶⁾, 75/84/EØF af 20. december 1974⁽⁷⁾ og 76/372/EØF af 1. marts 1976⁽⁸⁾ fastsat en række fællesskabsanalysemetoder; i betragtning af den hastighed, hvormed arbejdet siden da er skredet frem, bør der fastsættes en ottende serie af metoder;

de i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den stående Foderstofkomité —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

1. Medlemsstaterne foreskriver, at analyserne i forbindelse med den officielle kontrol af foderstoffer for så vidt angår deres indhold af zink-bacitracin, flavophospholipol, jern, kobber, mangan og zink skal foretages efter de metoder, der er beskrevet i bilaget til dette direktiv.

▼M1**▼B***Artikel 2*

Medlemsstaterne sætter den 1. januar 1979 de nødvendige administrative eller ved lov fastsatte bestemmelser i kraft for at efterkomme bestemmelserne i dette direktiv. De underretter straks Kommissionen herom.

Artikel 3

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

(1) EFT nr. L 170 af 3. 8. 1970, s. 2.

(2) EFT nr. L 155 af 12. 7. 1971, s. 13.

(3) EFT nr. L 279 af 20. 12. 1971, s. 7.

(4) EFT nr. L 123 af 29. 5. 1972, s. 6.

(5) EFT nr. L 83 af 30. 3. 1973, s. 21.

(6) EFT nr. L 108 af 22. 4. 1974, s. 7.

(7) EFT nr. L 32 af 5. 2. 1975, s. 26.

(8) EFT nr. L 102 af 15. 4. 1976, s. 8.

▼ **B***BILAG*▼ **M2****1. BESTEMMELSE AF ZINKBACITRACIN**

— ved diffusion på agarplader —

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Metoden anvendes til bestemmelse af zinkbacitracin i foderstoffer og forblandinger. Undergrænsen for bestemmelsen er 5 mg/kg (5 ppm)⁽¹⁾.

2. PRINCIP

Prøven ekstraheres ved pH 2 med en blanding af methanol, vand, saltsyre og natriumsulfidopløsning. Natriumsulfidet tilsættes for at udfælde opløselige kobbersalte, der kan påvirke bestemmelsen. Ekstratets pH indstilles til 6,5, og der inddampes (om nødvendigt) og fortyndes. Ekstraktets antibiotiske styrke bestemmes ved at måle diffusionen af zinkbacitracin i et agarsubstrat podet med *Micrococcus luteus (flavus)*. Diffusionen viser sig ved dannelse af zoner, hvori mikroorganismens vækst er hæmmet. Diameteren af disse zoner anses for at være direkte proportional med logaritmen til den antibiotiske styrke inden for de anvendte koncentrationer af antibiotikum.

3. TESTORGANISME: MICROCOCCUS LUTEUS (FLAVUS) ATCC 10240**3.1. Opbevaring af stamkulturen**

Micrococcus luteus (flavus) podes på skråagar med næringssubstrat (4.1) og inkuberes i 24 timer ved 30° C. Kulturen opbevares i køleskab ved ca. 4° C. Den ompodes hver anden uge.

3.2. Fremstilling af bakteriesuspension ^(a)

Væksten fra et skråagarglas (3.1) opslæmnes med 2 til 3 ml natriumchloridopløsning (4.3). Denne opslæmning anvendes til podning af 250 ml næringssubstrat (4.1) i en Roux-kolbe, og der inkuberes i 18 til 20 timer ved 30° C. Væksten opslæmnes i 25 ml natriumchloridopløsning (4.3) og fortyndes 10 gange med samme opløsning. Opslæmningens lystransmission skal være ca. 75 % målt ved 650 nm mod natriumchloridopløsning (4.3) i en 1 cm celle. Opslæmningen kan opbevares ved ca. 4° C i en uge.

4. NÆRINGSSUBSTRATER OG REAGENSER**4.1. Næringssubstrat ^(b)**

Kødpepton	6,0 g,
Trypton	4,0 g,
Gærekstrakt	3,0 g,
Kødekstrakt	1,5 g,
Glucose	1,0 g,
Agar	10,0 til 20,0 g,
Vand	1 000 ml,

pH 6,5 til 6,6 (efter sterilisering).

4.2. Testsubstrat ^(b)

Trypton	10,0 g,
Gærekstrakt	3,0 g,
Kødekstrakt	1,5 g,
Glucose	1,0 g,
Agar	10,0 til 20,0 g,
Tween 80	1 ml,
Vand	1 000 ml,

pH 6,5 (efter sterilisering).

4.3. Natriumchloridopløsning, 0,8 % (w/v): 8 g natriumchlorid opløses i vand, fortyndes til 1 000 ml og steriliseres.

⁽¹⁾ 1 mg zinkbacitracin af foderstofkvalitet svarer til 42 internationale enheder (IE).

^(a) Andre metoder kan anvendes, forudsat at det er bevist, at de giver tilsvarende bakteriesuspensioner.

^(b) Ethvert næringssubstrat af tilsvarende sammensætning, som er i handelen, og som giver de samme resultater, kan anvendes.

▼ **M2**

- 4.4. Blanding af methanol, vand og saltsyre (4.6): 80: 17,5: 2,5 (v/v/v).
- 4.5. **Phosphatbuffer, pH 6,5**
- | | |
|------------------------------------|-----------|
| Kaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4 | 22,15 g, |
| Kaliumhydrogenphosphat, KH_2PO_4 | 27,85 g, |
| Vand til | 1 000 ml. |
- 4.6. Saltsyre, d: 1,18—1,19
- 4.7. Saltsyre, 0,1 M.
- 4.8. Natriumhydroxid, 1 M.
- 4.9. Natriumsulfidopløsning, ca. 0,5 M.
- 4.10. Bromkresolpurpur, 0,04 % (w/v) opløsning: 0,1 g bromkresolpurpur opløses i 18,5 ml 0,01 M natriumhydroxid. Der fyldes op til 250 ml med vand og blandes.
- 4.11 Standardpræparat: zinkbacitracin af kendt styrke (i IE).

5. STANDARDOPLØSNINGER

Der afvejes en mængde zinkbacitracin (4.11) svarende til 1 050 IE (ifølge den opgivne styrke). Der tilsættes 5 ml 0,1 M saltsyre (4.7), og efter 15 minutters henstand tilsættes 30 ml vand. pH indstilles til 4,5 med phosphatbufferen (4.5) (ca. 4 ml), hvorefter der fyldes op til 50 ml med vand og blandes omhyggeligt (1 ml = 21 IE).

Af denne stamopløsning fremstilles ved successiv fortynding med phosphatbufferen (4.5) følgende opløsninger:

S_8	0,42	IE/ml,
S_4	0,21	IE/ml,
S_2	0,105	IE/ml,
S_1	0,0525	IE/ml.

6. FREMSTILLING AF EKSTRAKT OG TESTOPLØSNINGER

6.1. **Ekstraktion**6.1.1. *Forblandinger og mineralske foderstoffer*

2,0 til 5,0 g af prøven afvejes, og efter tilsætning af 29,0 ml af blandingen (4.4) og 1,0 ml natriumsulfidopløsning (4.9) rystes kortvarigt. Det kontrolleres, at pH er ca. 2. Der rystes i 10 min., tilsættes 30 ml phosphatbuffer (4.5), rystes i 15 minutter og centrifugeres. Der udtages en passende mængde af supernatanten, og pH indstilles til 6,5 med 1 M natriumhydroxid (4.8) enten ved hjælp af et pH-meter eller med bromkresolpurpuropløsningen (4.10) som indikator.

Der fortyndes med phosphatbuffer (4.5) indtil et forventet zinkbacitracinindhold på 0,42 IE/ml (= U_8).

6.1.2. *Proteinkoncentrater*

10,0 g af prøven afvejes, og efter tilsætning af 49,0 ml af blandingen (4.4) og 1,0 ml natriumsulfidopløsning (4.9) rystes kortvarigt. Det kontrolleres, at pH er ca. 2. Der rystes i 10 minutter, tilsættes 50 ml phosphatbuffer (4.5), rystes i 15 minutter og centrifugeres. Der udtages en passende mængde af supernatanten, og pH indstilles til 6,5 med 1 M natriumhydroxidopløsning (4.8) enten ved hjælp af et pH-meter eller med bromkresolpurpuropløsningen (4.10) som indikator. Der inddampes til ca. halvt volumen på rotationsfordamper ved højst 35° C.

Der fortyndes med phosphatbuffer (4.5) indtil et forventet zinkbacitracinindhold på 0,42 IE/ml (= U_8).

6.1.3. *Andre foderstoffer*

10,0 g af prøven afvejes (20,0 g ved et forventet zinkbacitracinindhold på 5 mg/kg). Der tilsættes 24 ml af blandingen (4.4) og 1,0 ml natriumsulfidopløsning (4.9), hvorefter der homogeniseres i 10 minutter. Der tilsættes 25 ml phosphatbuffer (4.5), rystes i 15 minutter og centrifugeres. Der udtages 20 ml af supernatanten, og pH indstilles til 6,5 med 1 M natriumhydroxid (4.8) enten ved hjælp af et pH-meter eller med bromkresolpurpuropløsningen (4.10) som indikator. Der inddampes til ca. 4 ml på rotationsfordamper ved højst 35° C. Remanensen fortyndes med phosphatbuffer (4.5) indtil et forventet zinkbacitracinindhold på 0,42 IE/ml (= U_8).

▼ **M2****6.2. Testopløsninger**

Opløsningerne U_4 (forventet indhold: 0,21 IE/ml), U_2 (forventet indhold 0,105 IE/ml) og U_1 (forventet indhold: 0,0525 IE/ml) fremstilles af opløsning U_8 ved successiv fortynding (1: 1) med fosfatbuffer (4.5).

7. TESTMETODE**7.1. Podning af testsubstratet**

Testsubstratet (4.2) podes med bakteriesuspensionen (3.2) ved ca. 50° C. På plader med testsubstrat (4.2) bestemmes forud den mængde bakteriesuspension, der giver de største og tydeligste hæmningszoner med de forskellige koncentrationer af zinkbacitracin.

7.2. Forberedelse af pladerne

Diffusionen i agar udføres på plader med de fire koncentrationer af standardopløsningen (S_8, S_4, S_2, S_1) og de fire koncentrationer af testopløsningen (U_8, U_4, U_2 og U_1). Disse fire koncentrationer af ekstrakt og standard skal nødvendigvis alle findes på hver plade. Der bør derfor vælges plader, der er store nok til at rumme mindst otte huller i agarsubstratet med en diameter på 10 til 13 mm og mindst 30 mm mellem hullernes centrum. Testen kan udføres på plader, der består af en glasplade med en aluminium- eller plastring ovenpå, 200 mm i diameter og 20 mm høj.

Pladerne påhældes substrat (4.1), der er podet som angivet i 7.1, så der opnås et ca. 2 mm tykt lag (60 ml til en plade på 200 mm i diameter). Pladerne anbringes vandret til størkning, hullerne udstanses, og nøjagtigt afmålte mængder af test- og standardopløsning anbringes i hullerne (mellem 0,10 og 0,15 ml pr. hul, afhængig af diameteren). Hver koncentration skal anbringes mindst fire gange, således at hver bestemmelse er baseret på en aflæsning af 32 hæmningszoner.

7.3. Inkubation

Pladerne inkuberes i 16 til 18 timer ved 30° C ± 2° C.

8. BEDØMMELSE

Hæmningszonernes diameter måles med 0,1 mm nøjagtighed. Middeldiameteren for hver koncentration afsættes på semilogaritmisk papir, således at de viser logaritmen til koncentrationen i forhold til hæmningszonernes diameter. Der indtegnes den »bedst tilpassede« rette linje for henholdsvis standardopløsningen og ekstraktet, f.eks. som vist nedenfor.

Det »bedst tilpassede punkt« for den laveste værdi for standardopløsningen (SL) bestemmes ved hjælp af formlen:

$$(a) \quad SL = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

Det »bedst tilpassede punkt« for den højeste værdi for standardopløsningen (SH) bestemmes ved hjælp af formlen:

$$(b) \quad SH = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

På tilsvarende måde beregnes det »bedst tilpassede punkt« for den laveste værdi for ekstraktet (UL) og den højeste værdi for ekstraktet (UH) ved at erstatte s_1, s_2, s_4 og s_8 med u_1, u_2, u_4 og u_8 i ovennævnte formler.

De beregnede SL- og SH-værdier indtegnes på samme millimeterpapir og forbindes til den »bedst tilpassede linje« for standardopløsningen. UL- og UH-værdierne indtegnes på tilsvarende måde og forbindes til den »bedst tilpassede linje« for ekstraktet.

Hvis der ikke er stoffer til stede, som forstyrrer analysen, vil linjerne være parallelle. Til praktiske formål kan linjerne betragtes som værende parallelle, hvis værdierne (SH-SL) og (UH-UL) ikke afgiver mere end 10 % fra middelværdien.

Såfremt linjerne viser sig ikke at være parallelle, kan enten u_1 og s_1 eller u_8 og s_8 udelades, og SL, SH, UL og UH beregnes ved hjælp af de alternative formler, for at opnå de alternative »bedst tilpassede linjer«:

▼ M2

$$(a') \text{ SL} = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \quad \text{eller} \quad \frac{5s_1 + 2s_4 - s_8}{6}$$

$$(b') \text{ SH} = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \quad \text{eller} \quad \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

og tilsvarende for UL og UH. De samme kriterier for parallelisme skal være opfyldt. Det noteres i den endelige rapport, at resultatet er beregnet ud fra tre koncentrationer.

Hvis linjerne kan betragtes som værende parallelle, beregnes logaritmen til den relative styrke (log A) ved hjælp af én af følgende formler alt efter om der er anvendt 3 eller 4 koncentrationer til at bestemme parallelismen.

For fire koncentrationer

$$(c) \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,602}{u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2}$$

For tre koncentrationer

$$(d) \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0,401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1}$$

eller

$$(d') \log A = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

Prøveekstraktets styrke = den pågældende standards styrke \times A:

$$(U_8 = S_8 \times A)$$

Hvis den relative styrke ligger uden for området 0,5 til 2,0, gentages analysen med den fornødne tilpasning af zinkbacitracin i ekstrakterne eller, hvis dette ikke er muligt, i standardopløsningerne. Hvis den relative styrke ikke kan bringes inden for det krævede interval, må de resultater, der opnås, betragtes som tilnærmede og dette bør anføres i den endelige rapport.

Hvis linjerne ikke kan betragtes som værende parallelle, gentages bestemmelsen. Hvis der stadig ikke opnås parallelisme, må bestemmelsen betragtes som utilfredsstillende.

Resultatet udtrykkes i milligram zinkbacitracin pr. kilogram foderstof.

9. REPETERBARHED

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser, udført på samme prøve af samme person, bør ikke overstige:

- 2 mg/kg i absolut værdi for et indhold af zinkbacitracin på til og med 10 mg/kg;
- 20 % i forhold til den højeste værdi for et indhold på over 10 og til og med 25 mg/kg;
- 5 mg/kg i absolut værdi for et indhold på over 25 til og med 50 mg/kg;
- 10 % i forhold til den højeste værdi for et indhold på over 50 mg/kg.

▼ B

2. BESTEMMELSE AF FLAVOPHOSPHOLIPOL - VED DIFFUSION PÅ AGARPLADER

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Metoden anvendes til bestemmelse af flavophospholipol i foderstoffer, koncentreter og forblandinger. Undergrænsen for bestemmelse er 1 mg/kg (1 ppm).

2. PRINCIP

Prøven ekstraheres med fortyndet methanol ved opvarmning under tilbagesvaling. Efter centrifugering oprenses ekstraktet (om nødvendig)

▼B

ved behandling med ionbytter og fortyndes. Dets antibiotiske styrke bestemmes ved at måle diffusionen af flavophospholipol i et agarsubstrat podet med *Staphylococcus aureus*. Diffusionen fremtræder som hæmning af mikroorganismens vækst i zoner. Diameteren af disse zoner anses for at have en retlinjet sammenhæng med logaritmen til den antibiotiske styrke for de anvendte antibiotiske koncentrationer.

3. MIKROORGANISME: STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 6538 P

3.1. Opbevaring af stamkulturen

Staphylococcus aureus podes på skråagar med næringssubstrat (4.1) og inkuberes i 24 timer ved 37° C. Kulturen opbevares i køleskab ved ca. 4° C og ompodes en gang om måneden på skråagar.

3.2. Fremstilling af bakteriesuspension^(a)

To skråagarglas med testorganismen (3.1) ompodes en gang om ugen, inkuberes i 24 timer ved 37° C og opbevares i køleskab ved 4° C. 24 timer før styrkebestemmelsen podes bakterien over på to til fire skråagarglas med næringssubstrat (4.1). Glassene inkuberes i 16—18 timer ved 37° C. Væksten suspenderes i natriumchloridopløsning (4.3). Lystransmissionen i suspensionen skal være ca. 40% over for natriumchloridopløsning (4.3) målt ved 578 nm i en 1 cl-celle.

4. NÆRINGSSUBSTRATER OG REAGENSER

4.1. Næringssubstrat^(b)

Kødpepton	6,0 g
Tryptone	4,0 g
Gærekstrakt	3,0 g
Kødeksktrakt	1,5 g
Glukose	1,0 g
Agar	15,0 g
Vand	1 000 ml

pH 6,5 (efter sterilisering).

4.2. Testsubstrat

4.2.1. Bundlag^(c)

Kødpepton	6,0 g
Gærekstrakt	3,0 g
Kødeksktrakt	1,5 g
Agar	10,0 g
Vand	1 000 ml

pH 6,5 (efter sterilisering)

4.2.2. Dæklag

Som 4.1, med tilsætning af 2,0 g silicone antifoam emulsion^(d).

4.3. Natriumchloridopløsning 0,4 % (w/v): 4 g natriumchlorid p.a. opløses i vand og fortyndes til 1 000 ml; steriliseres.

4.4. Methanol, ren.

4.5. Methanol 50 % (v/v): 500 ml methanol (4.4.) fortyndes med 500 ml vand.

4.6. Methanol 80 % (v/v): 800 ml methanol (4.4.) fortyndes med 200 ml vand.

4.7. Tris (hydroxymethyl) aminomethan p.a.

4.8. Kaliumchlorid i methanolopløsning 1,5 % (w/v): 1,5 g kaliumchlorid p.a. opløses i 20 ml vand, methanol (4.4) tilsættes ad 100 ml.

4.9. Kationbytter: Dowex 50 WX 8, 20—50 mesh, Na form (kat. Serva nr. 41 600) eller tilsvarende.

^(a) Andre metoder kan anvendes, forudsat at det er bevist, at de giver en tilsvarende bakteriesuspension.

^(b) Ethvert næringssubstrat af tilsvarende sammensætning, som er i handelen og som giver de samme resultater, kan anvendes, f.eks. Oxoid Antibiotic Medium 1 (CM 327) med tilsætning af Oxoid agar nr. 3 (L 13).

^(c) Ethvert næringssubstrat af tilsvarende sammensætning, som giver de samme resultater, kan anvendes, f.eks. Oxoid Antibiotic Medium 2 (CM 335) med tilsætning af Oxoid agar nr. 3 (L 13).

^(d) F. eks. SE 2 fra Wacker Chemie GmbH, München.

▼B

- 4.10. Anionbytter: Dowex 1X2, 50—100 mesh, Cl form (kat. Serva nr. 41 010) eller tilsvarende. Opbevares før brugen i 12—24 timer i 80 % methanol (4.6).
- 4.11. Glasuld
- 4.12. pH-indikatorpapir (pH 6,6—8,1).
- 4.13. Askorbinsyre.
- 4.14. Standardpræparat: flavophospholipol af kendt styrke.

5. APPARATUR

- 5.1. Glasrør til chromatografi, indre diameter: 9 mm, længde: 150—200 mm, udstyret med stophane i den indsnævrede del fornedet og slib (for tilslutning til skilletragten (5.2) foroven).
- 5.2. Skilletragt 250 ml, udstyret med stophane og slib.
- 5.3. 250 ml Erlenmeyer kolbe med slib.
- 5.4. Tilbageløbskøler med slib.

6. STANDARDOPLØSNINGER

En nøjagtig afvejede mængde af standardpræparatet (4.14) opløses i 50 % methanol (4.5) og fortyndes således at der fremkommer en stamopløsning indeholdende 100 µg flavophospholipol pr. ml. Opbevaret i tilproppede flasker ved 4° C vil denne opløsning være holdbar i indtil 2 måneder.

Af denne stamopløsning fremstilles ved successiv fortynding med 50 % methanol (4.5) følgende opløsninger:

s_8	0,2 µg/ml
s_4	0,1 µg/ml
s_2	0,05 µg/ml
s_1	0,025 µg/ml

7. FREMSTILLING AF EKSTRAKTET

7.1. **Ekstraktion**7.1.1. *Koncentrater, forblandinger og mineralfoder*

2,0 til 5,0 g af prøven afvejes, og 150 mg askorbinsyre (4.13) tilsættes. Prøven homogeniseres med 150 ml 50 % methanol (4.5) i en Erlenmeyer kolbe (5.3) og indstilles på pH 8,1—8,2 med ca. 400 mg tris (hydroxymethyl) aminomethan (4.7). pH kontrolleres med indikatorpapir (4.12). Efter henstand i 15 minutter korrigeres pH atter til 8,1—8,2 med tris (hydroxymethyl) aminomethan (4.7). Der koges i 10 minutter med tilbagesvaling (5.4) under konstant omrøring. Efter afkøling centrifugeres blandingen og ekstraktet dekanteres.

7.1.2. *Andet foder*

5,0 til 30,0 g af prøven med et indhold af mindst 30 µg flavophospholipol afvejes. Prøven homogeniseres med 150 ml 50 % methanol (4.5) i en Erlenmeyer kolbe (5.3) hvorefter pH indstilles på 8,1—8,2 med ca. 400 mg tris (hydroxymethyl) aminomethan (4.7). pH kontrolleres med indikatorpapir (4.12). Efter henstand i 15 minutter korrigeres pH på ny til 8,1—8,2 med tris (hydroxymethyl) aminomethan (4.7). Der koges i 10 minutter med tilbagesvaling (5.4) under konstant omrøring. Efter afkøling centrifugeres blandingen og ekstraktet dekanteres.

7.2. **Oprensning (dette kan udelades for koncentrater, forblandinger og mineralfoder)**

110 ml af ekstraktet blandes med 11 g af kationbyttet (4.9), koges i et minut med tilbagesvaling (5.4) under konstant omrøring. Kationbyttet skilles fra ved centrifugering eller filtrering. 100 ml ekstrakt blandes med 150 ml methanol (4.4) og opløsningen lagres i 12—15 timer ved 4° C. Den fremkomne udfældning filtreres fra i kold tilstand.

En prop af glasuld (4.11) anbringes i den nedre ende af et glasrør (5.1), 5 ml anionbytter (4.10) hældes i røret og søjlen udvaskes med 100 ml 80 % methanol (4.6). Ved hjælp af tragten (5.2) overføres mindst 100 ml koncentrat, som forventes at indeholde 16 µg flavophospholipol (200 ml til 30 g prøve af foder med 1 ppm) til søjlen. Om nødvendigt fortyndes filtratet med 80 % methanol (4.6) før overførsel til søjlen for at opnå et forventet flavophospholindhold på 16 µgpr. 100 ml. Tilpas væketilførslen til ca. 2 ml/minut. Den udstømmende væske kasseres. Derefter

▼B

udvaskes kolonnen med 50 ml 80 % methanol (4.6) og den udstømmende væske kasseres.

Flavophospholipol elueres med en methanolisk kaliumchloridopløsning (4.8) idet tilledningen holdes på omkring 2 ml pr. minut. 50 ml af eluatet opsamles i et måleglas, 30 ml vand tilsættes og der blandes. Opløsningen forventes at have et flavophospholipolindhold på 0,2 µg pr. ml (= u_8).

7.3 Testopløsninger

Om nødvendigt (dvs. når oprensning er undladt) fortyndes den i 7.1.1 fremstillede ekstrakt med 50 % methanol (4.5) med henblik på at opnå et forventet indhold af flavophospholipol på 0,2 µg pr. ml (= u_8).

Af opløsning u_8 fremstilles opløsning u_4 (forventet indhold: 0,1 µg/ml, u_2 (forventet indhold: 0,05 µg/ml) og u_1 (forventet indhold: 0,025 µg/ml) ved hjælp af successive fortyndinger (1 + 1) med 50 % methanol (4.5).

8. TESTUDFØRELSE

8.1. Podning af testsubstratet

Testsubstratet (4.2.2) podes med bakteriesuspensionen (3.2) ved ca. 50° C. Ved forudgående forsøg på plader med testsubstrat (4.2.2) bestemmes den mængde bakteriesuspension, der er nødvendig for at give de største og tydeligste hæmningszoner med de forskellige koncentrationer af flavophospholipol (ca. 30 ml pr. liter).

8.2 Fremstilling af pladerne

Testen udføres på plader med diffusion i agar af de fire koncentrationer af standardopløsning (s_8 , s_4 , s_2 og s_1) og de fire koncentrationer af testopløsning (u_8 , u_4 , u_2 og u_1). Disse fire koncentrationer af ekstrakt og standard skal nødvendigvis alle fire findes på hver plade. Der bør derfor vælges plader, der er store nok til at rumme mindst 8 huller i agarsubstratet med en diameter på 10—13 mm og mindst 30 mm mellem hullernes centrum. Testen kan udføres på plader, der består af en glasplade med en aluminium- eller plastring over, der er 200 mm i diameter og 20 mm høj.

Pladerne påhældes substrat (4.2.1) til et 1,5 mm tykt lag (45 ml for en plade på 200 mm i diameter). Pladerne anbringes vandret til størkning. Herefter påhældes dæklaget (4.2.2), der er podet som anført under punkt 8.1, således at der opnås et 1 mm tykt lag (30 ml for en plade på 200 mm i diameter). Pladerne anbringes atter vandret til størkning, hullerne udstanses og nøjagtige mængder af test- og standardopløsningerne anbringes i hullerne (mellem 0,10 og 0,15 ml pr. hul, afhængig af diameteren).

Hver koncentration skal anbringes mindst fire gange, således at hver bestemmelse er baseret på en aflæsning af 32 hæmningszoner.

8.3 Inkubering

Pladerne inkuberes i 16—18 timer ved 28—30° C.

9. BEDØMMELSE

Hæmningszonernes diameter måles til nærmeste 0,1 mm. Middeldiametrene for hver koncentration afsættes på semilogaritmisk papir, således at de viser logaritmen til koncentrationerne over for hæmningszonernes diameter. Der indtegnes den »bedst tilpassede« rette linie for henholdsvis standardopløsningen og ekstraktet f.eks. som vist nedenfor.

Det »bedst tilpassede punkt« (estimeret optimum) for den laveste værdi for standardopløsningen (SL) bestemmes ved hjælp af formlen:

$$(a) \quad SL = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

Det »bedst tilpassede punkt« (estimeret optimum) for den højeste værdi for standardopløsningen (SH) bestemmes ved hjælp af formlen:

$$(b) \quad SH = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - s_1}{10}$$

På tilsvarende måde beregnes »det bedst tilpassede punkt« for den laveste værdi for ekstraktet (UL) og den højeste værdi for ekstraktet

▼B

(UH) ved at erstatte s_1 , s_2 , s_4 og s_8 med u_1 , u_2 , u_4 og u_8 i ovennævnte formler.

De beregnede SL- og SH-værdier indtegnes på samme millimeterpapir og forbindes til »bedst tilpassede rette linie« for standardopløsningen. UL- og UH-værdierne indtegnes på tilsvarende måde og forbindes til »bedst tilpassede rette linie« for ekstraktet.

Hvis der ikke er stoffer tilstede, som forstyrrer analysen, vil linierne være parallelle, hvis værdien (SH—SL) og (UH—UL) ikke varierer mere fra middelværdien end 10 %.

Såfremt linierne viser sig ikke at være parallelle, kan enten u_1 og s_1 eller u_8 og s_8 udelades og SL, SH, UL og UH beregnes ved hjælp af den alternative formel for at opnå de alternative »bedst tilpassede linier«:

$$(a') \text{ SL} = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \text{ eller } \frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$$

$$(b') \text{ SL} = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \text{ eller } \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

og tilsvarende for UL og UH. Det kontrolleres om de alternative »bedst tilpassede linier« er parallelle som ovenfor. Det noteres i den endelige rapport, at resultatet er beregnet ud fra tre koncentrationer.

Hvis linierne kan betragtes som parallelle beregnes logaritmen til den relative styrke (log. A) ved hjælp af en af følgende formler.

For 4 koncentrationer

$$(c) \text{ log. A} = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

For 3 koncentrationer

$$(d) \text{ log. A} = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0,401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1}$$

eller

$$(d') \text{ log. A} = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

Faktisk styrke = formodet styrke \times relativ styrke

Hvis linierne ikke kan betragtes som parallelle gentages bestemmelsen. Hvis der stadig ikke opnås parallelisme beregnes logaritmen til den relative styrke (log. A) ved hjælp af formel (c). Det opnåede resultat skal imidlertid anses for omtrentligt og dette bemærkes i den endelige rapport.

10. REPETERBARHED

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser, udført på samme prøve af samme analytiker, bør ikke overstige:

0,5 mg/kg i absolut værdi for et indhold af flavophospholipol fra 1 til 2 mg/kg,

25 % i forhold til den højeste værdi for indhold der er større end 2 og op til 10 mg/kg,

20 % i forhold til den højeste værdi for indhold der er større end 10 og op til 25 mg/kg,

5 mg/kg i absolut værdi for indhold større end 25 og op til 50 mg/kg, 10 % i forhold til den højeste værdi for indhold over 50 mg/kg.

3. BESTEMMELSE AF MIKROMINERALERNE JERN, KOBBER, MANGAN OG ZINK

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Metoden gør det muligt at bestemme mikromineralerne jern, kobber, mangan og zink i foderstoffer. De nedre grænser for bestemmelsen er:

▼B

jern (Fe)	20 mg/kg
kobber (Cu)	10 mg/kg
mangan (Mn)	20 mg/kg
zink (Zn)	20 mg/kg

2. PRINCIP

Prøven opløses i saltsyre, efter at eventuelt organisk materiale er destrueret. Jern, kobber, mangan og zink bestemmes efter en passende fortynding ved anvendelse af atomabsorptionsspektrofotometri.

3. REAGENSER

Indledning

Ved fremstillingen af reagenser og analyseopløsninger anvendes vand, som ikke indeholder de kationer, der skal bestemmes. Vandet renses enten ved en dobbelt destillation af vandet i et borsilikat- eller kvartsddestillationsapparat eller gennem dobbelt behandling på ionbytter.

Kemikalierne skal mindst være analysekvalitet (p.a). Fravær af de mineraler, som skal bestemmes, kontrolleres ved blindbestemmelse. Om nødvendigt skal kemikalierne yderligere renses.

I stedet for stamopløsninger, som beskrevet nedenfor, kan kommercielle stamopløsninger anvendes på betingelse af de kontrolleres før brug.

3.1. Saltsyre p.a., $d = 1,19$

3.2. 6 N saltsyre p.a.

3.3. 0,5 N saltsyre p.a.

3.4. Flussyre 38—40 % (v/v) med et jernindhold på mindre end 1 mg/ Fe/l og med en inddampningsrest på mindre end 10 mg (som sulfat)/l.

3.5. Svovlsyre p.a., $d = 1,84$.

3.6. Hydrogenperoxid p.a., ca. 100 vol. ilt 30 vægtprocent).

3.7. Jernstamopløsning I (1000 µg Fe/ml) fremstilles som følger:

opløs 1 g jerntråd p.a. i 200 ml 6 N saltsyre (3.2), tilsæt 16 ml hydrogenperoxid (3.6) og fyld op til 1 l med vand.

3.7.1. Jernstamopløsning II (100 µg Fe/ml) fremstilles ved fortynding af stamopløsning (3.7) 1 + 9 med vand.

3.8. Kobberstamopløsning I (1000 µg Cu/ml) fremstilles som følger: opløs 1 g kobber i pulverform (p.a.) i 25 ml 6 N saltsyre (3.2), tilsæt 5 ml hydrogenperoxid (3.6) og fyld op til 1 l med vand.

3.8.1. Kobberstamopløsning II (10 µg Cu/ml) fremstilles ved fortynding af stamopløsning (3.8) 1 + 9 med vand og fortynd derefter den opnåede opløsning 1 + 9 med vand.

3.9. Manganopløsning I (1000 µg Mn/ml) fremstilles som følger: opløs 1 g mangan i pulver (p.a.) i 25 ml 6 N saltsyre (3.2) og fyld op til 1 l med vand.

3.9.1. Manganopløsning II (10 µg Mn/ml) fremstilles ved fortynding af stamopløsning (3.9) 1 + 9 med vand og fortynd derefter den opnåede opløsning 1 + 9 med vand.

3.10. Zinkstamopløsning I (1000 µg Zn/ml) fremstilles som følger: opløs 1 g zink i bånd eller bladform (p.a.) i 25 ml 6 N saltsyre (3.2) og fyld op til 1 l med vand.

3.10.1. Zinkstamopløsning II (10 µg Zn/ml) fremstilles ved fortynding af stamopløsning (3.10) 1 + 9 med vand og fortynd derefter den opnåede opløsning 1 + 9 med vand.

3.11. Lanthankloridopløsning fremstilles som følger: opløs 12 g lanthanoxid i 150 ml vand, tilsæt 100 ml 6 N saltsyre (3.2) og fyld op til 1 l med vand.

4. APPARATUR

4.1. Muffelovn med temperaturregulering og pyrometer.

4.2. Glasvarer skal være af modstandsdygtigt borsilikat, og det anbefales, at apparaturer udelukkende anvendes til bestemmelse af mineraler.

4.3. Platindigel eller kvartsdigel.

▼B

- 4.4. Atomabsorptionsspektrofotometer som fylder metodens krav med hensyn til følsomhed og nøjagtighed i det krævede område.

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. Prøver indeholdende organisk stof

5.1.1. Foraskning og opløsning af prøve til analyse(*)

- i) Afvej med 0,2 mg's nøjagtighed, 5—10 g af prøven i en kvarts- eller platindigel (4.3.) (se bemærkning b), prøven tørres i en ovn ved 105 °C, og digelen anbringes i en kold muffelovn (4.1). Ovnens lukkes (se bemærkning c), og temperaturen øges gradvis til 450—475 °C i løbet af ca. 90 min. Denne temperatur holdes i 4—16 timer (f.eks. natten over) for at fjerne organisk materiale hvorefter ovnen åbnes til afkøling (se bemærkning d).

Asken fugtes med vand og overføres til et 250 ml bægerglas. Digelen skylles med i alt ca. 5 ml saltsyre (3.1), der overføres langsomt og omhyggeligt til bægerglasset (en voldsom reaktion kan forekomme på grund af dannelse af CO₂).

Tilsæt saltsyre (3.1) dråbevis under omrøring, indtil enhver bruning er ophørt. Inddamp til tørhed under lejlighedsvis omrøring med en glasspatel.

Dernæst tilsættes 15 ml 6 N saltsyre (3.2) til inddampningsresten efterfulgt af ca. 120 ml vand. Der omrøres med glasspatelen, der forbliver i bægerglasset, som derefter tildækkes med et urglas. Indholdet bringes til svag kogning og holdes på kogepunktet, indtil der tilsyneladende ikke opløses mere aske. Filtrer gennem et askefrit filterpapir i en 250 ml målekolbe (se ii). Vask bægerglas og filter med 5 ml varm 6 N saltsyre (3.2) og 2 gange med kogende vand. Fyld målekolben op til mærket med vand (HCl koncentration ca. 0,5 N).

- ii) Hvis bundfaldet på filtret er sort (kulstof), sættes den tilbage i ovnen, og der foraskes igen ved 450—475° C. Denne foraskning, som kun kræver nogle få timer (ca. 3—5 timer), er gennemført, når asken er hvid eller næsten hvid. Opløs asken i ca. 2 ml saltsyre (3.1), inddamp til tørhed og tilsæt 5 ml 6 N saltsyre (3.2). Opvarm, filtrer opløsningen i målekolben og fyld op til mærket med vand (ca. 0,5 N HCl-koncentration).

Bemærkninger:

- a) Ved bestemmelse af mikromineraler er det vigtigt at være klar over risikoen for forurening især med zink, kobber og jern. Derfor skal det udstyr, som anvendes til forbehandling af prøverne, være fri for disse metaller.

For at mindske den almindelige forureningsrisiko arbejdes i en støvfri atmosfære med pinligt rent udstyr og omhyggeligt afvaskede glasvarer. Bestemmelsen af zink er særlig følsom over for mange typer forurening f.eks. fra glas, reagenser, støv osv.

- b) Vægten af den prøve, som skal foraskes, skal beregnes ud fra det omtrentlige forventede indhold af mikromineraler i foderstoffet i relation til det anvendte spektrofotometers følsomhed. For visse foderstoffer, hvis mikromineralindhold er lavt, kan det være nødvendigt at starte med en prøve på 10—20 g og begrænse den endelige opløsning til kun 100 ml.
- c) Foraskning skal udføres i en lukket ovn uden gennemblæsning med luft eller ilt.
- d) Pyrometerets temperaturudvisning må ikke overstige 475° C.

5.1.2. Spektrofotometrisk bestemmelse

5.1.2.1. Fremstilling af standardopløsninger

(*) Grøntfoder (frisk eller tørret) indeholder ofte store mængder vegetabilsk silicium, som kan binde mikromineraler, og derfor må fjernes. Ved prøver af sådanne foderstoffer skal derfor følgende ændrede fremgangsmåde anvendes. Udfør det under 5.1.1 i) beskrevne indtil filtreringen. Vask filterpapiret indeholdende den uopløselige rest 2 gange med kogende vand og anbring det i en platindigel (4.3). Forask i muffelovnen (4.1) ved en temperatur under 550° C indtil alt kulstofholdigt materiale fuldstændig er forsvundet. Afkøl, tilsæt nogle få dråber vand efterfulgt af 10—15 ml flussyre (3.4) og inddamp til tørhed ved ca. 150° C. Hvis der stadig er silicium i inddampningsresten, genopløses denne i nogle få ml flussyre (3.4) og inddampes til tørhed. Tilsæt 5 dråber svovlsyre (3.5) og opvarm, indtil der ikke mere afgives hvide dampe. Efter tilsætning af 5 ml 6 N saltsyre (3.2) og ca. 30 ml vand opvarmes opløsningen; derefter filtreres denne ned i en 250 ml målekolbe, og der fyldes op til mærket med vand (HCl koncentration ca. 0,5 N). Fortsæt derefter bestemmelsen fra 5.1.3.

▼B

For hver af de grundstoffer, som skal bestemmes, skal der ud fra stamopløsningerne 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 og 3.10.1 fremstilles en række standardopløsninger (100 ml målekolber) hver med en HCl koncentration på ca. 0,5 N og (ved jern, mangan og zink) en lanthanklorid koncentration svarende til 0,1 % La (w/v). De valgte koncentrationer for mikromineraler skal ligge inden for det anvendte spektrofotometers følsomhedsområde. Eksempelvis er i tabellerne nedenfor angivet sammensætningen af typiske rækker af standardopløsninger. Afhængig af Spektrofotometer og dets følsomhed kan det imidlertid blive nødvendigt at vælge andre koncentrationer

Jern

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml stamopløsning II (3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe) + ml 6 N HCl (3.2)	0	0,5	1	2	3	4	5
	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml lanthankloridopløsning (3.11) fyld op til 100 ml med vand

Kobber

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	0,1
ml stamopløsning II (3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu) + ml 6 N HCl (3.2)	0	1	2	4	6	8	10
	8	8	8	8	8	8	8

Fyld op til 100 ml med vand

Mangan

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml stamopløsning II (3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn) + ml 6 N HCl (3.2)	0	1	2	4	6	8	10
	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml lanthankloridopløsning (3.11) og fyld op til 100 ml med vand

Zink

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml stamopløsning (3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn) + ml 6 N HCl (3.2)	0	0,5	1	2	4	6	8
	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml lanthankloridopløsning (3.11) og fyld op til 100 ml med vand

5.1.2.2 Fremstilling af prøveopløsning til analyse

Til bestemmelse af kobber kan den opløsning, som er fremstillet under 5.1.1, normalt direkte anvendes. Hvis det er nødvendigt at bringe dens koncentration ind i standardopløsningernes område, kan en alikvot del afpiteres i en 100 ml målekolbe, derefter fyldes op til mærket 0,5 N saltsyre (3.3).

Til bestemmelse af jern, mangan og zink afpiteres en alikvot del af den af 5.1.1 fremstillede opløsning i en 100 ml målekolbe, der tilsættes 10 ml lanthankloridopløsning (3.11), og der fyldes op til mærket med 0,5 N saltsyre (3.3).

(se også 8, »Bemærkning«).

▼B

5.1.2.3. Blindbestemmelsen skal indeholde alle trinene under fremgangsmåden, blot skal prøvematerialet udelades. Standardopløsning »0« må ikke anvendes som blind.

5.1.2.4. Måling af atomabsorption

Atomabsorptionen for standardopløsningerne og den opløsning som skal analyseres, måles ved anvendelse af en oxiderende luftacetylenflamme ved følgende bølgelængder:

Fe	248,3 nm
Cu	324,8 nm
Mn	279,5 nm
Zn	213,8 nm

Hver af målingerne gentages fire gange.

5.2. **Mineralske foderstoffer**

Hvis prøven ikke indeholder organisk materiale, er forudgående foraskning unødvendig. Fremgangsmåden i 5.1.1 i) følges, idet der startes fra afsnit 2. Fordampning under tilstedeværelse af flussyre kan udelades.

6. **BEREGNING AF RESULTATER**

Ved anvendelse af en kalibreringskurve beregnes koncentrationen af mikromineralet i den opløsning, som skal analyseres, og resultatet udtrykkes i mg mikromineral pr. kg prøve (ppm).

7. **REPETERBARHED**

Forskellen mellem resultaterne af de to sideløbende bestemmelser, udført på samme prøve af samme analytiker, bør ikke overstige:

- 5 mg/kg i absolut værdi for mikromineralindhold op til 50 mg/kg;
- 10 % af de højeste resultat for mikromineralindhold fra 50 til 100 mg/kg;
- 10 mg/kg i absolut værdi for mikromineralindhold fra 100 til 200 mg/kg;
- 5 % af det højeste resultat for mikromineralindhold over 200 mg/kg.

8. **BEMÆRKNING**

Tilstedeværelse af store mængder fosfater kan interfere på bestemmelsen af jern, mangan og zink. Denne interferens skal korrigeres gennem tilsætning af en lanthankloridopløsning (3.11). Hvis imidlertid vægtforholdet $\frac{\text{Ca} + \text{Mg}}{\text{P}}$ 2 i prøven, kan tilsætning af lanthanklorid (3.11) til den opløsning, som skal analyseres og til standardopløsningerne, udelades.